

Dr hab. N. farm. Lucyna Konieczna

Gdańsk, 12.03.2023 r.

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

e-mail: lucyna.konieczna@gumed.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Hanny Nikolaichuk
zatytułowanej „Effect-directed analysis of Rhodiola Rosea L. based on planar
chromatography: the search for bioactive components”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Hanny Nikolaichuk, zawiera 57 stron właściwej dysertacji stanowiącej kompleksowy opis sześciu publikacji naukowych, zamieszczonych w 5-ciu czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania IF 15,882 (MEiN 460).

Na początku pracy zamieszczono listę skrótów, listę figur i tabel oraz listę publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej. Zwięzły trzypięciowy wstęp zawiera informacje o roli leku roślinnego w leczeniu różnych chorób. Problematyka badań podjęta przez Panią Hannę Nikolaichuk dotycząca poszukiwania składników bioaktywnych na podstawie ukierunkowanej analizy Rhodiola Rosea L. techniką chromatografii planarnej, wykonana w Katedrze Chromatografii pod promotorstwem prof. Ireny Choma Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, jest jak najbardziej aktualna, wpisująca się w nowoczesne trendy wykorzystywania naturalnych związków bioaktywnych o właściwościach leczniczych we współczesnej medycynie. Obecnie ludzkość zmaga się z coraz większą ilością chorób cywilizacyjnych, takich jak cukrzyca, choroby neurologiczne, w tym neurodegeneracyjne, jak choroba Alzheimera, Parkinsona, oraz otyłość czy choroby nowotworowe, wynikających z ogromnego postępu cywilizacyjnego. Współczesny człowiek coraz bardziej docenia znaczenie leków pochodzenia naturalnego i ich stosowanie jako preparatów leczniczych. Towarzyszący nam w ostatnich latach ogromny rozwój technik analitycznych, biotechnologicznych i instrumentalnych oraz szeroki dostęp do bardziej zaawansowanej aparatury badawczej umożliwia odpowiednią kontrolę jakościową i ilościową nowych preparatów ziołowych. Do tej pory poważne obawy co do jakości, bezpieczeństwa i skuteczności leków ziołowych, ustępują na rzecz nowo opracowanych, zwalidowanych, wiarygodnych, i skutecznych metodyk analitycznych zapewniających rzetelną wiedzę na temat składu jakościowego i ilościowego leku pochodzenia naturalnego. Analiza leku roślinnego jest wyzwaniem dla analityka, ponieważ rośliny zawierają złożone mieszaniny chemiczne, często bardzo wielu związków, które są słabo scharakteryzowane, często niestabilne, stąd należy wziąć pod uwagę możliwe efekty synergistyczne, agonistyczne i antagonistyczne. Z tego powodu trudno jest zapewnić pacjenta, że lecznicze produkty roślinne są bezpieczne i zapewniają oczekiwaną bioaktywność.

Praca została przygotowana w formie zbioru sześciu publikacji, w tym jednej przeglądowej i 5 oryginalnych, gdzie poza artykułem o charakterze przeglądowym, doktorant jest w pozostałych pierwszym autorem, co należy podkreślić. Artykuły zostały opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, co Doktorantka wyszczególniła na str 7-8: *Journal of Chromatography A* (IF 4,601, MEiN: 100), dwa artykuły w *Molecules* (IF 4,927, MEiN: 140), *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* (IF 1,467, MEiN: 40). Sumaryczny współczynnik oddziaływania prac włączonych do dysertacji jest znaczący, wynosi IF 15,882 (MEiN: 460). Do pracy zostały włączone oświadczenia współautorów, które wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w opracowywaniu koncepcji badań eksperymentalnych, interpretacji otrzymanych wyników i przygotowania manuskryptu. Publikacje zostały już ocenione przez niezależnych ekspertów z danej dziedziny, zaakceptowane i opublikowane.

Forma pracy jest typowa dla obecnie składanych prac doktorskich, opartych na wynikach badań już opublikowanych. Praca składa się z listy skrótów / list of abbreviations (str 4-5), listy rysunków i tabel/ list of figures and tables (str 6-7), listy publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej/ list of publications included in the doctoral thesis (str 7-8), wstępu / introduction (str, 9-10), celu / aim and objectives of the thesis (str 13-14), metod badawczych / research methods (str 15-22), opisu wyników / overview of results (str. 23-40), wniosków / conclusions (str. 41-42), bibliografii / bibliography (str. 43-46), biografii naukowej Doktorantki/ scientific biography (str. 47), osiągnięć naukowych / scientific achievements (str. 48), w tym: publikacje / publications (str. 48-49), konferencje / conferences (str. 50-54), zajęcia laboratoryjne, jednostki współpracujące (str. 55), (podsumowania / summary (str 56).

Doktorantka zamieściła elementy składowe rozprawy doktorskiej z podziałem na rozdziały (str. 57). Rozdział pierwszy „Wprowadzenie” – zawiera krótki zarys aktualnych badań nad roślinami leczniczymi *Rhodiola rosea* L., chromatografią planarną i analizą ukierunkowaną na efekt; 2. Rozdział drugi „Cel i zadania” – określa cel główny i cele pracy; 3. Rozdział trzeci „Metody badawcze” – prezentuje metody i techniki badawcze; 4. Czwarty rozdział „Przegląd wyników” – to zwięzłe i spójne omówienie wyników badań; 5. Rozdział piąty „Wnioski” – zawiera omówienie i podsumowanie głównych osiągnięć pracy. Pracę zamyka spis bibliografii, egzemplarze sześciu publikacji stanowiących całość prowadzonych badań oraz bibliografia naukowa i dorobek naukowy Doktorantki.

W części zatytułowanej „Wprowadzenie” Doktorantka słusznie opisała trudności związane z analizą leku roślinnego, często o nieznanym składzie, a co za tym idzie, trudno o zapewnienie, że produkty lecznicze są w pełni niezawodne i wywołają pożądaną aktywność biologiczną. Doktorantka zaznaczyła, że produkty ziołowe mają ogromne znaczenie dla konsumentów, stąd podlegają przepisom obowiązkowej weryfikacji jakości i bezpieczeństwa produktów zielarskich w oparciu o akt prawny – Dyrektywę w sprawie tradycyjnych ziołowych produktów (formalnie dyrektywa 2004/24/WE). Pomimo tego aktu prawnego, jak słusznie zauważyła Doktorantka, jest na rynku wiele produktów roślinnych o potencjalnym ryzyku manipulacji co do składu i związanej z tym różnej bioaktywności. Jedną z takich roślin jest *Rhodiola rosea* L., bardzo często „podrabiany” produkt z powodu szerokiego zakresu bioaktywności i korzystnego wpływu na organizm człowieka.

Doktorantka przybliżyła właściwości *Rhodiola rosea* L., znanej również jako korzeń arktyczny, różaniec górski lub złocisty korzeń, jest wieloletnią rośliną z rodziny Crassuaceae stosowaną w Europie i Azji, między innymi w tradycyjnej Medycynie Chińskiej. Autorka wskazała na szeroki zakres właściwości leczniczych i aktywności biologicznej *Rhodiola rosea* L., ze szczególnym wskazaniem na poprawę odporności organizmu, działanie przeciwnowotworowe, przeciwstresowe, przeciwstarzeniowe, niwelujące zmęczenie, wykazuje także właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwwirusowe. *R. rosea* jest zalecana sportowcom i osobom starszym celem zmniejszenia uczucia zmęczenia. Ponadto

spożywanie *R. rosea* jest wskazane w leczeniu zaburzeń psychicznych oraz poprawie pamięci i uczenia się. Produkty handlowe *R. rosea* oparte są na korzeniu i/lub kłączu.

We wstępie Doktorantka również opisała zalety planarnej chromatografii w analizie roślin takich jak niski koszt, metoda przyjazna dla środowiska, proste przygotowanie próbek nawet w przypadku skomplikowanych matryc, jednoczesna separacja 40 próbek na jednej płytce TLC, możliwość szybkiej zmiany warunków chromatograficznych, co umożliwia szybki wybór optymalnej fazy stacjonarnej i ruchomej. Ponadto planarna chromatografia daje bezpośrednią możliwość sprzężenia z (bio)testami (bioprofilowanie) i przeprowadzenia derywatyzacji (profilowanie chemiczne). Powyższe zalety powodują, że technika planarna zyskuje w odniesieniu do droższych metod jak HPLC czy CE. Metodę tę cechuje ogromna elastyczność – może być sprzężona z innymi technikami spektroskopowymi, np. spektrometrią mas z desorpcyjną jonizacją laserową wspomaganą matrycą (MALDI), desorpcyjną jonizacją przez elektrorozpylanie (DESI), umożliwia analizę w czasie rzeczywistym (DART) i jedna z najważniejszych jej zalet to metoda pomiarowa EDA oparta na chromatografii planarnej do profilowania bioaktywności i głównych składników ziół, stad. Ważną cechą chromatografii planarnej jest połączenie (HP)TLC z (bio)testami, a następnie analiza za pomocą spektrometrii mas lub magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

Cel pracy został jasno sformułowany przez Doktorantkę jako poszukiwanie składników bioaktywnych *rosea L.* za pomocą ukierunkowanej na efekt chromatografii planarnej. Badania miały na celu stworzenie bioprofilu oraz opracowanie ukierunkowanych i nieukierunkowanych analiz pozwalających na oddzielenie, identyfikację i wizualizację związków aktywnych *R. rosea* – jednej z najbardziej intrygujących roślin leczniczych. Oczekiwano, że opracowanie takich profili pomoże wzbogacić wiedzę na temat odmian tej rośliny, wykryć różnice w ich składzie chemicznym i bioaktywności (potwierdzenia autentyczności, wykrycie ewentualnych fałszerstw). Aby osiągnąć cel główny, Doktorantka dokonała optymalizacji układów chromatograficznych opartych na TLC i HPTLC, dokonała wyboru odpowiednich testów i je zastosowała, zidentyfikowała kluczowe składniki w oparciu o wzorce referencyjne, dokonała (bio)profilowania próbek wraz z autentycznym odniesieniem do *R. rosea*, dokonała wstępnej identyfikacji związków aktywnych. Jeden z głównych etapów, który obejmował optymalizację warunków separacji chromatograficznej wykonany został w Katedrze Chromatografii UMCS w Lublinie oraz w Katedrze Żywności Justus Liebig University Giessen w Niemczech. Profilowanie chemiczne i fizykochemiczne ekstraktów *R. rosea* metodą TLC-UV VIS-FLD z wykorzystaniem procedur derywatyzacji z różnymi odczynnikami wykonano w Katedrze Chromatografii UMCS w Lublinie. Z kolei profilowanie mikrochemiczne, biologiczne i biochemiczne ekstraktów *R. rosea* przy użyciu chromatografii planarnej ukierunkowanej na efekt stosując różne testy ze wskazaniem różnych mechanizmów działania i związków aktywnych, wykonano w Zakładzie Mikrobiologii Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i w Katedrze Nauk o Żywności Uniwersytetu im. Justusa Liebiga w Giessen w Niemczech. Podobnie charakterystyka związków i stref aktywnych metodą mikrofrakcjonowania offline TLC poddanych analizie HPLC-ESI-MS wykonano w UMCS w Lublinie, analizę HPTLC-HPLC, HESI-HRMS w Katedrze Nauk o Żywności Uniwersytetu im. Justusa Liebiga w Giessen w Niemczech. Jakościowa i ilościowa ocena związków markerowych *R. rosea* metodą HPLC-DAD i ¹H NMR wykonana została w Katedrze Chemii Fizycznej oraz Organicznej Wydziału Chemii UMCS w Lublinie.

Cykl prac włączony do dysertacji stanowi spójną całość, złożony jest z pracy przeglądowej [D1] pięciu publikacji naukowych [D2-D6].

Po zastosowaniu wielu technik analitycznych Doktorantka zrealizowała założone na początku pracy cele badawcze, uzyskała unikalne profile chromatograficzne *R. rosea* (za pomocą celowanych i niecelowanych analiz ukierunkowanych na efekt, opartych na

połączeniu chromatografii planarnej (bio)testów i metod spektroskopowych) w celu identyfikacji składu chemicznego *R. rosea* oraz oceny ich bioaktywności.

Podsumowując, główne osiągnięcia Doktorantki są następujące:

1. Bioprofilowanie ekstraktów *R. rosea* pozwoliło na wykrycie 17 różnych aktywności *R. rosea*, w tym przeciwutleniające, AChE, BChE, α -amylaza, α -glukozydaza, β -glukuronidaza, lipaza, tyrozynazy, przeciwbakteryjne wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych *A. fischeri* i Gram-dodatnich *B. subtilis*, genotoksyczne, a także estrogenowe oraz zweryfikowane antyestrogen i androgen oraz zweryfikowane działanie antyandrogenowe. Wykryto następujące aktywności głównych związków *R. rosea*:
 - rozawina – hamuje α -glukozydazę, β -glukuronidazę, lipazę i tyrozynazę jako jak również środek przeciwbakteryjny przeciwko *B. subtilis*;
 - salidrozyd – przeciwutleniacz i hamujący α -glukozydazę, β -glukuronidazę i lipazy, a także działa przeciwbakteryjnie na *A. fischeri* i *B. subtilis*;
 - p-tyrozol – przeciwutleniacz oraz hamujący α -glukozydazę, lipazę i tyrozynazę;
 - rozaryna – hamuje działanie antyoksydacyjne i β -glukuronidazy;
 - kalafonia – hamuje BChE i działa antibakteryjnie na *A. fischeri*;
 - wirydozyd i rozyrydyna – przeciwutleniacz, hamujący aktywność AChE i β -glukuronidazy oraz przeciwbakteryjny wobec *A. fischeri*;
 - rodiolozyd D – hamuje tyrozynazę i działa przeciwbakteryjnie na *B. subtilis*;
 - kwasy palmitynowy i stearynowy – hamowanie α -amylazy hydrochinon – przeciwutleniacz, hamujący AChE, α -glukozydazę i lipazę, i genotoksyczne oraz przeciwbakteryjne wobec *B. subtilis*.
2. Analiza offline HPLC-ESI-MS, a także HPTLC-HPLC-HESI-HRMS online dostarczyły informacji jakościowych na temat obecności 29 związków w ekstraktach *R. rosea*, a mianowicie rozawiny, rozaryny, kalafonii, salidrozydu, p-tyrozolu, wirydozydu, rodiolozydu D, rozyrydyna, galaktoza, sacharoza, glukoza, kwas kawowy, kwas chlorogenowy, kwas ferulowy, kwas galusowy, kwas palmitynowy, kwas stearynowy, alkohol cynamonowy, kemferol, luteolina, luteolina-7-O-Glc, apigenina, apigenina-7-Glc, herbacetyna, rodiozyna, rodionina, rodioflawonozyd, rodiolgin i hydrochinon.
3. Ocena jakościowa i ilościowa rozawiny, salidrozydu i p-tyrozolu (tak zwane związki markerowe *R. rosea*) za pomocą analizy HPLC-DAD i ¹H NMR ujawnia obecność rozawiny tylko w trzech, natomiast salidrozydu i p-tyrozolu tylko w czterech z siedmiu zbadanych ekstraktów dostępnych na rynku preparatów *R. rosea*. Stężenia obliczono liczbę znaczników. Uzyskane wyniki, takie jak obecność genotoksyn w dwóch i brak rosavin w czterech produktach z *R. rosea* podkreślają znaczenie ukierunkowanego na efekt profilowania roślinnych materiałów pod kątem autentyczności i weryfikacji jakości oraz szukania śladów fałszerstw. Analiza ukierunkowana na efekt oparta na chromatografii planarnej wypełnia lukę w tej zależności między chromatograficznym odciskiem palca, skutecznością roślin leczniczych i pilną potrzebą kontroli jakości leków ziołowych. Metoda ustalona tutaj dla *R. rosea* może zostać wdrożona dla innych roślin leczniczych, zwłaszcza tych dostępnych w handlu. Przedstawione w pracy podejścia dowodzą, że chromatografia planarna wciąż aktualizuje się, rozwija, i spełnia wymagania stawiane metodom analitycznym, a także jest doskonałym narzędziem do szybkiego, precyzyjnego, wiarygodnego, i solidnego wykrywania aktywności roślin i ich składników.

Wykonanie podjętych przez Doktorantkę zadań wymagało szerokich umiejętności analitycznych, dobrania właściwej metodyki prowadzonych prac eksperymentalnych

obejmujących techniki takie jak TLC, TLC-UV VIS-FLD, HPLC-ESI-MS oraz HPTLC-HPLC, HESI-HRMS.

Na uwagę zasługuje wieloaspektowość i interdyscyplinarność podjętego zadania badawczego, obejmująca szereg współprac z różnymi ośrodkami badawczymi, w tym z Katedrą Nauk o Żywności Uniwersytetu im. Justusa Liebiga w Giessen w Niemczech, Zakładem Mikrobiologii Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Katedrą Chemii Fizycznej oraz Organicznej Wydziału Chemii UMCS w Lublinie.

Wnioski są prawidłowo sformułowane, a osiągnięcia Doktorantki wymienione powyżej w *Podsumowaniu* oceniam jako znaczące.

Z obowiązku recenzenta kilka uwag, które nie wpływają na ocenę merytoryczną przedstawionej do recenzji pracy:

- brak ujednoczenia stosowanej terminologii w całej pracy, Doktorantka zamiennie stosuje pojęcia takie jak „lek roślinny”, „suplement”, w związku z tym proszę o podanie definicji, jak Doktorantka rozumie te pojęcia
- brak streszczenia w języku polskim, który ułatwiłby czytelnikowi zapoznanie się z tematyką przeprowadzonych badań, założeniami pracy w postaci postawionej tezy badawczej, otrzymanych wyników i sformułowanych wniosków.
- na stronie 57 Doktorantka zamieściła elementy składowe rozprawy doktorskiej z podziałem na rozdziały, czytelniej byłoby zamieścić ten punkt przed rozdziałem 1: wprowadzenie.
- opublikowane prace D1-D6 nie zostały umieszczone w ciągu chronologicznym, dlaczego?
- wobec tak dużej ilości dokonanych eksperymentów Doktorantka mogłaby wskazać, które etapy pracy badawczej wykonywała samodzielnie, a które zostały wykonane przez innych badaczy. To nakreśliłoby profil Doktorantki, jej osobisty wkład pracy i opanowanie warsztatu analitycznego,
- w dokonanych przez Doktorantkę oznaczeniach ilościowych opisana została metoda z włączeniem optymalizacji fazy ruchomej, która jednak nie została zwalidowana, walidacja jest obowiązkowym elementem opracowanych metodyk analitycznych

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca wpisuje się w aktualne trendy badawcze powrotu do coraz szerszego stosowania leku pochodzenia naturalnego, pogłębiania wiedzy o jego składzie, badaniach (bio)aktywności zawartych w nim związków czynnych w oparciu o połączone techniki analityczne.

Praca zawiera wiele elementów nowości. Dorobek naukowy doktorantki stanowiący cykl sześciu publikacji jest znaczący i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Hanny Nikolaichuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej pani mgr Hanny Nikolaichuk.

Uzasadnienie

Oceniana praca wnosi istotny twórczy wkład w rozwój nauk farmaceutycznych związanych z opracowaniem ukierunkowanych i nieukierunkowanych analiz pozwalających na oddzielenie, identyfikację i wizualizację związków aktywnych *R. rosea* – jednej z najbardziej intrygujących roślin leczniczych. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w formie sześciu prac oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych, w pięciu z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny IF publikacji będący podstawą dysertacji jest znaczący, wynosi 15,882, a punktacja ministerialna wynosi 460.

Lucyna Kowalska